

99/00230
17.0.2

10/030118

REC'D 03 APR 2000

WIPO PCT

대한민국 특허청

KOREAN INDUSTRIAL
PROPERTY OFFICE

별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Industrial
Property Office.

출원번호 : 특허출원 1999년 제27167호
Application Number

출원년월일 : 1999년 07월 07일
Date of Application

출원인 : 한국과학기술연구원
Applicant(s)

**PRIORITY
DOCUMENT**

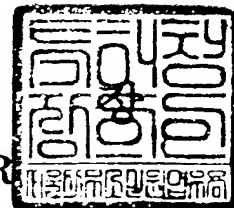
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



2000 년 03월 17 일

특 허 청

COMMISSIONER



【서류명】 특허출원서
【권리구분】 특허
【수신처】 특허청장
【참조번호】 1227
【제출일자】 1999.07.07
【국제특허분류】 C02F

【발명의 명칭】 미생물의 전기화학적 농화배양 방법 및 유기물질 및 BOD 분 석용 바이오센서

【발명의 영문명칭】 An Electrochemical Method for Enrichment of Microorganism, a Biosensor for Analyzing Organic Substance and BOD

【출원인】

【명칭】 한국과학기술연구원

【출원인코드】 3-1998-007751-8

【대리인】

【성명】 주성민

【대리인코드】 9-1998-000517-7

【포괄위임등록번호】 1999-023588-9

【대리인】

【성명】 장수길

【대리인코드】 9-1998-000482-8

【포괄위임등록번호】 1999-023587-1

【발명자】

【성명의 국문표기】 김 병홍

【성명의 영문표기】 KIM, Byung-Hong

【주민등록번호】 450406-1025014

【우편번호】 130-080

【주소】 서울특별시 동대문구 이문동 264-440 삼익주택 30호

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 장 인섭

【성명의 영문표기】 CHANG, In-Seop

【주민등록번호】 670322-1046120

【우편번호】 138-222
 【주소】 서울특별시 송파구 잠실2동 주공아파트 2단지 204-106호
 【국적】 KR
 【발명자】
 【성명의 국문표기】 현 문식
 【성명의 영문표기】 HYUN, Moon-Sik

【주민등록번호】 570915-1953118
 【우편번호】 138-747
 【주소】 서울특별시 송파구 가락2동 가락 쌍용아파트 303-2403호
 【국적】 KR
 【발명자】
 【성명의 국문표기】 김 형주
 【성명의 영문표기】 KIM, Hyung-Joo
 【주민등록번호】 631012-1051141
 【우편번호】 135-260
 【주소】 서울특별시 강남구 포이동 242-2 현대탑빌라 103호
 【국적】 KR

【발명자】
 【성명의 국문표기】 박 형수
 【성명의 영문표기】 PARK, Hyung-Soo
 【주민등록번호】 671004-1480910
 【우편번호】 139-754
 【주소】 서울특별시 노원구 상계7동 주공아파트 407동 1502호
 【국적】 KR

【심사청구】 청구

【취지】 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인
 주성민 (인) 대리인
 장수길 (인)

【수수료】

【기본출원료】 20 면 29,000 원
 【가산출원료】 8 면 8,000 원

1019990027167

2000 3 23

【우선권주장료】	0	건	0	원
【심사청구료】	6	항	301.000	원
【합계】	338.000	원		
【첨부서류】	1.	요약서·명세서(도면)_1통		

【요약서】

【요약】

본 발명에 따라, 혐기적 조건에서 매개체 없는 생물연료 전지를 사용하여 전기화학적 방법으로 시료 속의 유기물 농도 또는 BOD를 측정할 수 있는 바이오센서가 제공된

다. BOD 측정용 바이오센서에 사용되는 생물연료 전지의 전기화학적 활성 세균은 생물연료 전지의 운전 과정에서 농화 배양된 폐수 빗 슬러지 속에 포함된 활성 세균이 사용된다. 따라서, 본 발명의 BOD 바이오센서는 인위적인 미생물의 첨가 없이 운전될 수 있으며 폐수에 따라 적절한 세균의 활성이 유지될 수 있다. 바이오센서용 생물 연료 전지는 6개월 이상 안정적으로 작동할 수 있다.

【대표도】

도 1

【색인어】

금속염 환원 세균, 전기 화학적 활성 세균, 바이오 센서, 무매개체 생물연료전지, 농화 배양
법

【명세서】

【발명의 명칭】

미생물의 전기화학적 농화배양 방법 및 유기물질 및 BOD 분석용 바이오센서 {An Electrochemical Method for Enrichment of Microorganism, and a Biosensor for Analyzing Organic Substance and BOD}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 생물 연료전지 형태의 특정 미생물 농화 장치를 이용한 BOD 측정용 바이오센서의 모식도.

도 2는 본 발명에 따른 생물연료전지형 바이오센서에 첨가된 시료의 COD와 전류의 관계를 나타내는 그래프.

도 3은 생물연료전지의 바이오센서에 첨가된 시료의 COD 및 발생한 적산전류량과의 상관 관계를 나타내는 그래프.

도 4은 정전위 전해장치 (potentiostat)을 이용한 특정 미생물의 농화 배양용 장치와 이를 이용한 BOD 측정용 바이오센서의 모식도.

도 5는 실시예 2에 따른 정전위 전해장치를 사용하여 전기화학적 활성 세균이 농화 배양된 생물연료전지형 바이오센서에 첨가된 시료의 COD와 전류의 관계를 나타내는 그래프.

도 6은 본 발명에 따른 생물연료전지형 바이오센서의 작업 전극표면에 농화된 미생물의 주사전자현미경 사진.

도 7은 본 발명에 따른 연료 전지형 컷산 농도 측정 바이오센서의 모식도.

도 8은 젖산 농도 측정시 발생하는 전류 기록의 일반적인 형태.

도 9는 젖산 농도 및 전류 발생시 초기 기울기간의 상관 관계를 나타내는 그래프.

도 10은 본 발명에 따른 BOD 측정용 바이오센서를 사용한 경우 6개월 간의 첨가된 COD 농도에 따른 전류량을 나타내는 그래프.

<도면의 주요 부분에 대한 부호의 설명>

- 1, 201: 음극
- 2, 202: 양극
- 3, 203: 양이온 교환막
- 4, 204: 음극부
- 5, 205: 양극부
- 6: 누수 방지용 실리콘 고무막
- 7, 8: 음극 및 양극 배선 연결부
- 9: 시료 및 질소 투입구
- 10: 시료 및 질소 방출구
- 11: 공기 및 물 또는 인산 완충용액 투입구
- 12: 공기 및 물 또는 인산 완충용액 방출구
- 13: 보호대
- 14: 고정용 나사
- 101: 작업전극

102: 보조전극

104: 작업전극부

105: 보조전극부

109, 209: 시료 투입 및 채취구

110, 210: 질소 배출구

111, 211: 질소 투입구

112: 체크 밸브

113: 온/오프온 기준전극

114, 214: 자석 교반기

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<35> 본 발명은 유기물 농도 및 BOD 측정용 바이오센서에 관한 것으로, 더욱 구체적으로는 측정이 간단하고 신속하며, 응용성 및 제작, 유지, 보수에 필요한 비용이 저렴한 유기물 농도 및 BOD 측정용 바이오센서에 관한 것이다.

<36> 일반적으로, 바이오센서란 측정부의 일부 또는 전부로서 생물체 또는 생물체에서 유래한 물질이 사용되며, 이 측정부가 전기적 장치와 결합된 측정 장치를 의미한다. 바이오센서는 생물 반응이 갖는 고도의 특이성 때문에 측정 물질의 농도 및 성상을 정밀하게 측정할 수 있다는 장점이 있어, 1960년대부터 이에 대한 연구가 지속적으로 이루어져 왔다. 그 결과, 다양한 종류의 바이오센서가 개발되었고, 그 측정 물질의 범위도 다양

하여졌다. 예를 들면, 글루코스 옥시다제와 산소 전극을 결합하여 제작한 글루코스 농도 측정용 바이오센서 및 항체를 사용한 의학용 바이오센서가 현재 실용화되어 널리 사용되고 있다 [참조. Tuner 등, 1987: Biosensors, Fundamentals and applications, Oxford Science Publications].

<37> 한편, 공장 가동시 발생하는 폐수나 가정에서 발생하는 하수 등의 오염도는 일반적으로 화학적 산소요구량 (Chemical Oxygen Demand, COD) 또는 생화학적 산소요구량 (Biochemical Oxygen Demand, BOD)으로 환산하여 표시되며 이들의 신속한 측정은 환경 및 공해방지 관련 산업에 있어서 대단히 중요한 의미를 갖는다. 그러나, 폐수 중에 존재하는 미생물 자화성 유기물질의 양을 의미하는 BOD를 측정하는 종래의 방법은 시간이 오래걸리고, 여러 가지 복잡한 과정과 장치가 필요하다는 문제점이 있다. 또한, 작업자의 숙련도에 따라 그 값의 편차가 발생할 뿐만 아니라 수질의 오염 상태를 긴급히 확인하고자 할 경우나 또는 폐수처리 공정의 자동화 시설의 설치시 적용하기 어려운 문제점이 있다.

<38> 이러한 문제점을 해결하기 위하여 몇 종의 BOD 측정용 바이오센서가 개발되었다 [참조: Hikuma 등, 1979: European Journal of Microbiology and Biotechnology, 8, 289; Riedel 등 1990: Water Research, 24, 883; Hyun 등, 1993: Biotechnology and Bioengineering, 41, 1107]. 상기 언급된 BOD 센서는 일반적으로 용존산소 측정용 전극에 특정 미생물을 고정화시킨 막을 부착한 형태로서, 이때 BOD 센서를 측정하고자 하는 시료와 반응시키면 막에 고정화된 미생물이 시료내의 유기물을 자화하면서 산소를 소비하게 되고, 이때의 용존산소 값을 대조

구의 용존산소 값과 비교하여 이를 BOD로 환산함으로써 측정한다. 그러나, 이와같은 BOD 측정용 바이오 센서는 아래와 같은 문제점이 있다.

- <39> 첫째, 1종의 미생물을 사용하기 때문에 사용된 미생물의 기질 특이성으로 인하여 폐수 속의 복합 영양 성분에 대한 자화성이 부족하기 때문에 BOD의 전체 값을 나타낼 수 없다.
- <40> 둘째, 다공성 막에 미생물을 고정시켰기 때문에 재현성이 높은 BOD 측정치를 얻기 위해서는 수시로 막을 교환, 수리해야 하는데, 사용되는 미생물 고정막의 가격이 높으므로, 비경제적이고 정비성도 불량하다.
- <41> 셋째, 대조구용 용존산소 전극 또는 대조시료를 사용하여야 하기 때문에 장치가 복잡하고, 장비의 가격 및 고장률이 높다.
- <42> 넷째, 종래 BOD 측정용 바이오 센서에 사용되는 미생물은 미생물의 외부에서 전기화학적 활성을 직접 측정할 수 없으므로 전자전달 매개체 (electrochemical mediator)나 별도의 변환기 (transducer)를 부착하여야 한다.
- <43> 한편, 일반적으로 혐기적 환경에서 생장하는 미생물은 산소이외에 다른 전자 수용체를 사용할 수 있으며, 이러한 전자수용체를 사용하여 대사하는 과정을 미생물의 혐기적 호흡이라고 일컫는다. 혐기적으로 호흡하는 미생물이 유기물을 산화할 때 이용할 수 있는 전자 수용체로는 산화제이철, 질산염, 6가 망간, 황산염, 탄산염 등이 있다. 전자 공여체가 동일한 경우, 미생물 전자전달계내의 산화환원 반응에서 발생하는 에너지는 산화제이철이 산화제일철로 환원될 때가 가장 크고, 질산염, 황산염, 탄산염의 차례로 낮아지게 되는데 이는 각각의 전자 수용체가 갖는 고유 특성인 산화환원 전위와 관계가

있다 [참조: 김병홍, 1995: 미생물 생리학, 아카데미서적].

<44> 이러한 혐기적 호흡을 수행하는 미생물인 금속염 환원세균이 이용하는 전자 수용체 중 산화 제이철 등은 물에 대한 용해도가 극히 낮기 때문에 호기성 미생물의 일반적인 전자 수용체인 산소와는 달리 불용성 전자수용체를 세포 내부로 흡수하여 환원할 수 없다. 따라서, 금속염 환원 세균의 경우 외부에 존재하는 전자 수용체를 환원하기 위해서 특수한 형태의 전자전달 시스템이 존재한다. 예를 들면, 산화제이철을 전자 수용체로 이용하는 금속염 환원 세균의 일종인 *지오박터 설퍼리듀센스* (*Geobacter sulfurreducens*)와 *시와넬라 푸트레파시엔스* (*Shewanella putrefaciens*)의 경우 전자전달 단백질인 사이토크롬이 존재하며, 이 사이토크롬을 통하여 미생물 내부에서 산화된 유기물에서 발생한 전자가 외부의 전자 수용체로 전달되고, 이러한 일련의 전자전달 과정을 통하여 발생한 에너지를 이용하여 성장하게 된다 [참조: Myers and Myers, 1992, Journal of Bacteriology, 174, 3429-3438; Seeliger 등 1998, Journal of Bacteriology, 180: 3686-3691]. 따라서, 유사한 성질을 갖는 이들 금속염 환원세균은 유기물의 대사시 발생하는 전자를 외부의 불용성 전자 수용체에 전달하여 전자 수용체를 환원시키므로 유기물의 양은 외부의 전자 수용체의 환원량과 비례하게 되고, 이 전자 수용체를 대체할 수 있는 적당한 전극을 이용하면 미생물 내부에서 발생하는 전자가 전극을 환원시키고 전극에 직접 전달된 전자는 회로를 통하여 외부로 흐를 수 있게 된다. 이러한 미생물의 생리학적 특성을 이용하는 생물 연료전지 등이 대한민국 특허 공개공보 제1998-16777호 (1998년 6월 5일)에 개시되어 있으며, 본원에 참고로 도입된다.

<45> 그런데, 상기 금속염 환원 세균을 이용한 생물 연료 전지에 있어서, 전자의 양은 미생물의 농도, 유기물의 양 등에 비례하게 되므로, 발생한 전자의 양을 측정함으로써

시료 중에 존재하는 유기물의 양을 측정할 수 있게 된다.

<46> 따라서, 본 발명자들은 이러한 생물연료 전지 및 사용된 미생물과 유기물에 대한 연구를 거듭한 결과, 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<47> 본 발명의 목적은 상기한 종래의 BOD 측정용 바이오센서의 문제점을 갖고 있지 않는 개선된 BOD 측정용 바이오센서 및 그를 사용한 BOD 측정 방법을 제공하는 것이다.

<48> 상기 본 발명의 목적에 따라, 측정부, 전류검출부 및 검출된 전류변화를 기록하는 기록부를 포함하며, 상기 측정부는 양극 및 음극, 이들 양극 및 음극의 전도매체 및 이들 두 극 사이의 이온 교환막을 포함하는 무매개체 생물 연료 전지로 이루어지고, 상기 음극부에는 전기화학적 활성 세균을 함유하는 시료가 첨가된 것을 특징으로 하는 BOD 측정용 바이오센서가 제공된다.

<49> 또한, 상기 BOD 측정용 바이오센서에서, 음극과 양극을 저항을 거쳐 연결한 후, 음극부에는 질소를 공급하여 혐기성 조건으로, 양극부에는 공기를 공급하여 호기성 조건으로 만들어, 시료 중에 존재하는 전기화학적 활성 세균을 상기 음극부에 농화 배양시키고, 상기 농화 배양된 전기화학적 활성 세균을 미생물 촉매로 이용함으로써 발생된 전류를 측정하는 것을 특징으로 하는 시료 중의 BOD 측정 방법이 제공된다.

<50> 또한, 본 발명의 또 다른 관점에서, 측정부, 전류 검출부 및 검출된 전류 변화를 기록하는 기록부를 포함하며, 상기 측정부는 양극 및 음극, 이들 양극 및 음극의 전도매체 및 이들 두 극 사이의 이온 교환막을 포함하는 무매개체 생물 연료 전지로 이루어지고, 상기 음극부에 소정의 유기물을 대사하는 단일종의 전기화학적 활성 세균이 포함되

어 있는 것을 특징으로 하는 무매개체 생물 연료 전지형 유기물 농도 측정용 바이오센서가 제공된다.

<51> 또한, 상기 유기물 농도 측정용 바이오센서에서, 양극부에는 공기를 계속적으로 공급하여 음극부와 전압차를 유지시키면서, 측정하고자 하는 시료를 음극부에 첨가하여 음극부에 포함된 세균이 유기물을 소비하면서 생산되는 전자의 흐름을 측정함으로써 해당 유기물의 농도를 측정하는 것을 특징으로 하는 유기물 농도 측정 방법이 제공된다.

<52> 본 발명의 또 다른 관점에서, 양극 및 음극, 이들 양극 및 음극의 전도매체 및 이들 두 극 사이의 이온 교환막으로 이루어지는 무매개체 생물 연료 전지에서, 음극부에는 활성 슬러지와 폐수를 첨가하고, 음극과 양극을 저항을 거쳐 연결한 후, 음극부에는 질소를 공급하여 혐기성 조건으로, 양극부에는 공기를 공급하여 호기성 조건으로 만들어 별도의 전자수용체없이 활성 슬러지와 폐수 중에 존재하는 전기화학적 활성 세균을 농화배양하는 방법이 제공된다.

【발명의 구성 및 작용】

<53> 본 발명은 전기화학적으로 활성을 갖는 미생물을 사용하여 전자전달 매개체나 변환기(transducer) 없이 미생물 자체의 유기물 자화력 및 전자전달 능력을 이용하여 폐수 속의 미생물 자화성 성분(BOD)이나 젖산 등의 유기물의 농도를 측정할 수 있는 바이오센서에 관한 것이다.

<54> 본 발명의 일면에서, BOD 측정용 바이오센서는 측정부, 전류 검출부 및 검출된 전류변화를 기록하는 기록부를 포함하며, 상기 측정부는 양극 및 음극, 이들 양극 및 음극의 전도매체 및 이들 두 극 사이의 이온 교환막을 포함하는 무매개체 생물 연료 전지를

이루어지고, 상기 음극부에는 전기화학적 활성 세균을 함유하는 시료가 첨가된다.

<55> 즉, 특정 시료 내의 유기물과 활성 슬러지를 중균 시료로 하여 전기화학적으로 활성이 있는 전기화학적 활성 세균을 전기화학적 방법으로 전극 및 전극을 포함하는 전극부에 농화 배양하고, 상기 농화 배양된 전기화학적 활성 세균을 미생물 촉매로 이용함으로써 전력을 생산시키면, 생산된 전력은 측정부로 사용된 생물 연료전지에 첨가된 미생물 자화성 성분인 각종 유기물 농도에 비례하게 됨으로써, 이를 검출 기록함으로써 시료 중의 BOD를 측정할 수 있게 된다.

<56> 또한, 바람직하게는 상기 측정부의 음극부에 전기화학적 활성 세균의 농화배양을 촉진하기 위하여, 정전위 전해강치를 사용할 수 있다.

<57> 본 발명의 목적상 전기화학적 활성 세균은 폐수내의 유기물을 산화하여 발생하는 전자를 세포 외부로 방출하여 직접적으로 전극에 전달하여 전류를 발생시킬 수 있는 세균을 말하며, 대표적인 것으로는 금속염 환원세균을 들 수 있다.

<58> 본 발명의 또 다른 면에서, 유기물 농도 측정용 바이오센서는 상기 생물 연료전지의 전극 자체 또는 전극부에 특정 유기 물질을 기질로하는 특정한 전기화학적으로 활성인 세균을 포함시키고, 이를 그대로 바이오센서의 측정부로 이용한다. 즉, 특정한 유기물을 대사하는 전기화학적 활성 세균을 음극부에 포함시킴으로써, 생물 연료전지에 의하여 발생한 전력은 시료중에 존재하는 특정 유기물의 대사에 의한 것이되고, 이를 측정함으로써 시료중의 유기물 농도를 측정할 수 있게 된다.

<59> 하기에서는 상기 설명한 바와 같은 BOD 및 유기물 농도를 측정하는 방법에 대해서 구체적으로 설명한다.

<60> 1) 전기화학적 활성 세균의 농화 배양 및 이를 이용한 BOD 측정용 바이오센서

<61> 폐수에서 발생하는 활성 슬러지 및 혐기성 슬러지에는 다량의 절환원 세균을 포함한 여러 종류의 금속염 환원세균이 높은 농도로 존재하는 것으로 최근의 연구에서 확인되었다 [참조: Nielsen 등, 1997, Systematic and Applied Microbiology, 20, 645-651;

Nielsen 등, 1996, Water Science and Technology, 34, 129-136; Rasmussens 등, 1994, Water Research, 28, 417-425].

<62> 따라서, 활성 슬러지나 폐수 등 여러 종의 미생물이 혼합되어있는 시료를 평균으로 삼아 전극이 포함된 배양조에서 적당한 배지와 함께 혐기적으로 배양하면 전극을 전자 수용체로 사용할 수 있는 미생물만이 최종적으로 생존할 수 있게 되고, 이들 미생물 중은 사이토크롬과 같은 전자전달체를 가지고 있어 전기화학적 활성을 갖는다. 따라서, 이와 같은 방법으로 폐수나 활성 슬러지 등에 존재하는 여러종의 미생물 중 전기화학적 활성을 갖는 균을 선택적으로 농화 배양할 수 있다.

<63> 한편, 폐수나 오염된 하수에는 다양한 유형의 유기물이 포함되어 있으므로, 이들 폐수나 하수의 BOD를 일률적인 방법으로, 즉 한 종류의 미생물만으로 측정하는 것은 대단히 힘들며 측정시 오차 또한 크다. 따라서, 서로 다른 유기 폐수 및 활성 슬러지 중의 다양한 전기화학적 활성 세균을 상기 설명한 바처럼 농화 배양하고, 농화배양된 이들 활성 세균들을 측정부의 생물 연료전지의 미생물 촉매로 이용함으로써, 생산된 전력량을 통하여 시료중의 BOD를 측정할 수 있다.

<64> 2) 생물연료전지형 바이오센서를 사용한 유기물 농도 측정

<65> 상기 BOD 측정용 바이오센서에서 설명한 바와 같은 생물연료 전지에서 음극부에는

측정하고자 하는 기질에 따라 적합한 전기화학적으로 활성인 단일종의 미생물을 포함시킨다. 양극부에는 공기를 계속적으로 공급하여 음극부와 전압차를 유지시키고, 측정하고자 하는 시료를 음극부에 첨가하면 음극부에 포함된 미생물이 해당 기질을 소비하면서 생산되는 전자가 직접 음극을 통하여 외부의 회로로 흘러나가게 되고, 이를 측정함으로써

해당 기질의 농도를 측정할 수 있다. 따라서, 이와 같은 원리로 다양한 기질을 소비하는 전기화학적으로 활성이 있는 세균을 사용함으로써 다양한 기질, 즉 상응하는 해당 유기물의 농도를 측정할 수 있다.

<66> 이제, 첨부된 도면을 참조로 하여, 하기에서 본 발명이 더욱 자세하게 설명된다.

<67> 도 1은 생물 연료전지 형태의 농화 배양 장치를 이용한 BOD 센서의 모식도이다.

양극부 (5)에 산소를 공급하여 양극 (2)와 음극 (1)에 전위차를 부여하였으며, 음극부 (4)에 시료 (예를 들면, 폐수 및 슬러지)를 첨가하고, 양극부에 인산 완충용액 또는 수도물을 첨가한다. 음극부에는 혐기적 상태를 유지하기 위하여 질소를, 양극부에는 공기를 공급하여 단위 전지의 전압차를 유지할 수 있다. 일정 시간이 지난 후 (일반적으로 3주) 음극에는 특정 폐수를 기질로 하여 농화된 전기화학적 활성을 갖는 미생물이 부착되며, 여기서 부착된 미생물이 기질을 산화하여 발생하는 전기를 적절히 측정하면 폐수 속의 BOD 증감을 측정할 수 있다. 본 발명에서는 상기 양극과 음극은 동일하게 탄소 부직포로 구성하였으나, 상황에 따라 여러가지 다른 재료의 전극을 사용할 수 있다.

<68> 도 4은 본 발명의 바람직한 구현예인 전기화학적 농화 배양법을 이용한 BOD 센서의 구성도이다. 이 경우 전극의 전압을 일정하게 유지하기 위하여 정전위 전해장치 (potentiostat)를 사용한다. 여기서, 작업전극 (101)은 전가 수용체로서 작용하며 전극에 대한 적용 전압을 변화시킬 때 따라 미생물에 대한 전기화학적 작용이 다를 수 있다.

작업전극의 재질은 탄소 부직포이며, 기준 전극 (113)으로는 은/염화은 (Ag/AgCl)이, 보조전극 (102)으로는 백금이 사용된다. 기준전극은 작업전극의 작용전압을 유지, 보정해주는 역할을 하며 보조전극은 작업전극과 전기적 회로를 구성한다. 이 장치는 작업전극에 일정한 전위를 가하고 (염화은 기준전극에 대하여 일반적으로 +0.98 V) 시료 (폐수 및 슬러지)를 공급하여 특정 폐수속의 전기 화학적 활성세균을 일정기간 (일반적으로 2 주) 농화 배양하고, 이에 따라 전극에 부착(농화)된 미생물 및 장치를 그대로 BOD 측정용 바이오 센서로 사용할 수 있다.

<69> 본 발명의 이점 및 목적은 하기 설명되는 실시예를 통하여 더욱 잘 이해될 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

<70> <실시예 1>

<71> 생물연료전지를 이용한 전기화학 활성을 갖는 미생물 농화와 COD 농도에 따른 생물 연료전지의 전류 변화

<72> 특정 폐수중의 유기물을 전자 공여체로 이용하는 전기 화학적으로 활성이 있는 미생물을 농화 배양하기 위하여 도 1에 표시된 것과 같은 장치를 제작하였다.

<73> 본 실험에서는 전분가공 폐수 (출처: 삼양 세넥스, 대한민국 인천소재)를 이용하였으며, 동일 공장의 폐수처리에서 발생한 활성 슬러지를 접종원으로 사용하였다. 생물 연료전지의 기본 형태는 베네토 등의 문헌 [참조: Bennetto 등, 1985, Biotechnology Letters, 7, 699-704]을 참조하였다. 전극은 양극 (2), 음극 (1) 모두 탄소 부직포 (크기: 5 x 7.5 x 0.6 cm)로 하였으며, 전극의 배선은 백금선을 사용하였다 [본 발명에서는 미생물(또는 미생물의 전자전달물질)이 전극에 의하여 산화되는 장소를 음극부 (4)라

하고, 외부회로를 통하여 이동된 전자가 다시 전극에서 산화제를 환원시키는 부분을 양극부 (5)라 한다]. 음극부와 양극부는 이온 교환막 (3)으로 분리되며 음극 (1)과 양극 (2)은 외부의 회로를 통하여 연결된다. 이때, 외부의 회로에 적당한 저항을 연결하면 음극과 양극 사이의 전류 흐름을 제어할 수 있다. 양극부 (작업 용량: 30 ml)에는 공기를

공급하고 음극부 (작업 용량: 30 ml)에는 폐수와 슬러지 등의 시료를 첨가하였다.

음극부에 폐수 및 슬러지를 첨가한 후 음극과 양극을 저항을 거쳐 연결한 후 음극부에 질소를 공급하여 혐기적 조건으로, 양극부에 공기를 공급하여 호기적 조건으로 만들어 농화 배양을 시작하였다. 약 3주간의 농화배양을 거친 후 배경 전류가 일정하게 유지되었을 때 일정한 농도의 BOD를 가지고 있는 폐수를 첨가하여 발생하는 전류의 총량을 적산하였다.

<74> 전류가 기본값을 나타낼 때 다른 농도의 COD를 갖는 폐수 (출처: 삼양 제넥스, 대한민국 인천 소재)를 첨가하였다. 도 2에서 보는 바와 같이 발생하는 전류량은 첨가된 폐수의 COD에 비례하여 증가하였다. 또한, 도 3에서 보는 바와 같이 적산 전류값은 첨가된 시료의 COD가 증가함에 따라 비례적으로 증가하였다.

<75> 한편, 상기 제작된 BOD 센서를 6개월 동안 작동시키면서, 1개월 마다 COD 50 ppm과 100 ppm을 각각 첨가하여 발생하는 전류량을 측정하였다. 도 10에 나타난 것처럼 발생하는 전류량은 거의 변화없이 일정하게 유지되었다. 따라서, 발생하는 전류량은 BOD의 센서의 작동 기간에 관계없이 첨가된 COD의 양에 따라 일정한 값을 유지하며 작동될 수 있다.

<7> <실시예 2>

<77> 정전위 전해장치가 장착된 생물연료전지를 이용한 전기화학적 활성 미생물의 농화와 COD 농도에 따른 전류변화

<78> 전기 화학적으로 활성이 있는 미생물을 효과적으로 농화 배양하기 위하여 도 4에 표시된 것과 같은 장치를 제작하였다. 전기화학 셀 (Electrochemical cell)의 재질은 파이렉스 유리를 사용하였으며 용량은 500 ml로 하였다. 미생물이 농화되는 부분에는 작업 전극 (탄소 부직포) (101)이 정전위 전해장치와 연결되어 부착되어 있으며 전기적 회로를 구성하기 위하여 보조전극 (백금선) (102)을 부착하고 이를 정전위 전해장치와 연결하였다. 미생물이 농화되는 작업전극부와 보조전극부는 투석막으로 분리되어있다. 작업전극부 (104) 및 보조 전극부 (105)에는 같은 농도의 폐수를 첨가하였다. 작업전극을 일정전위로 유지하기 위하여 기준전극 (113)을 부착하였으며 작업전극의 전위는 정전위 전해장치에 의하여 조절된다. 시료의 투입 및 채취구 (109)를 장착하고, 필요에 따라 혐기적 조건을 유지하기 위하여 질소가스를 공급하였다. 이 질소 주입구 및 배출구 (110, 111)는 연속적인 시료의 공급의 필요시 질소 대신에 시료의 공급 및 배출구로도 사용할 수 있다. 작업전극과 보조전극간의 전압 및 전류의 변화는 정전위 전해장치를 통하여 증폭되고 이를 컴퓨터를 이용한 기록 장치나 기록지를 이용하는 레코더로 기록하였다. 농화 배양은 작업 전극부에 균원 시료로 활성 슬러지를 첨가한 후 정전위 전해장치를 작동시켜 작업 전극이 고정된 전위를 유지하게 하는 것으로 개시하였다. 본 실험에서 폐수 및 활성 슬러지는 전분가공 폐수 (출처: 삼양 제넥스, 대한민국 인천 소재)를 이용하였다.

<79> 농화 배양은 폐수 및 활성 슬러지를 작업전극부에 첨가한 후 작업전극을 +0.98 v로 고정하여 시작하였다. 실험 개시 후 14일간 가동 하였을때 작업 전극과 보조전극간의

전류는 약 $50 \mu\text{A}$ 에서 최대 $322 \mu\text{A}$ 로 증가하였으며, 작업 18일 경과 후 약 $153 \mu\text{A}$ 에서 전류가 안정화되었다. 전류가 안정화되었을 때 농도가 다른 폐수를 시료 투입구를 통하여 투여한 결과 전류의 값이 도 2와 유사한 양상으로 증가하였다. 시료 투입구 (109)와 질소배출구 (110)를 통하여 폐수를 연속적으로 투입-방출하며, 작업 전극과 보조 전극 사이의 전류를 확인하였을 때 투입된 폐수의 농도에 따라 전류의 변화를 확인할 수 있었다 (참조, 도 5). 따라서, 이 장치를 사용하여 BOD를 연속적으로 측정하는 것이 가능하다는 것을 알 수 있으며, 장치를 분해하여 전극을 주사 전자현미경으로 관찰한 결과 다량의 미생물이 전극에 부착되어 있음을 확인할 수 있었다 (도 6). 전극에서 분리한 미생물을 배양하고 순환 전류법으로 조사한 결과 전기화학적으로 활성이 있는 것으로 확인되었다.

<80> <실시예 3>

<81> 생물연료전지형 BOD 센서의 음극 및 음극부내의 금속염 환원 세균수 변화

<82> 실시예 2에서 사용된 생물연료전지 형태의 BOD 센서의 농화 배양 과정 및 작동중 음극부에서 음극을 시료로 채취하여 철환원 세균의 균체수를 조사하였다. 배지는 인산염 완충액 기본 배지 (PBEM)를 사용하였으며, 배지성분은 효모 추출물 1 g/L , 염화암모늄 1 g/L , Macro-mineral (II) 25 ml/L (리터당 $6 \text{ g KH}_2\text{PO}_4$, 12 g NaCl , $2.4 \text{ g MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 및 $1.6 \text{ g CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 포함), 미량원소 2 ml/L (리터당 12.8 g 니트로아세트산, $0.1 \text{ g FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $0.1 \text{ g MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $0.17 \text{ g CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $0.1 \text{ g CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g ZnCl_2 , $0.02 \text{ g CuCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $0.1 \text{ g H}_3\text{BO}_3$, 0.01 g 몰리브덴염, 1.0 g NaCl , $0.017 \text{ g Na}_2\text{SeO}_3$, $0.026 \text{ g NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 포함), 비타민액 0.1 ml/L (0.002 g 비오틴, 0.002 g 엽산, 0.010 g B6(피리독신)HCl, 0.005 g B1(티아민)HCl, 0.005 g B2(리보플라빈), 0.005 g 니코틴산(니아신), 0.005 g 판토텐산,

0.0001g B12 (시아노코발라민) 결정, 0.005g PABA, 0.005g 리폰산 (티옥트산), 레사주린 (Resazurin) (0.2%) 1 ml/L와 한천 1.8%를 첨가하여 평판 배지를 제조하였다. 이때, 전자공여체로 아세트산 20 mM, 젖산 30 mM, 포도당 20 mM을 각각 사용하였으며, 전자수용체로 수용성 철인 페릭 피로포스페이트 (Ferric pyrophosphate) 20 mM을 사용하였다.

1차 시기는 반응 초기 연료전지의 호기성 슬러지와 혐기성 슬러지의 시료를 생리 식염수 (0.85% 소금물)로 희석하여 CFU (Colony Forming Unit /ml)로 측정하였고, 2차와 3차 시기는 반응후 각각 1 개월후 동일한 배지와 방법으로 측정하였다. 결과를 하기 표 1에 나타내었다.

<83> 【표 1】

생물연료 전지 음극부내의 특정 미생물 군체수 변화

시료	전자공여체 (mM)	전자수용체 (mM)	1차	2차	3차
호기성 슬러지	아세트산 (20)	페릭피로포스페이트 (20)	2.8×10^7	0.9×10^4	5.1×10^3
	포도당 (20)	페릭피로포스페이트 (20)	8.0×10^7	1.3×10^5	4.2×10^4
	젖산 (30)	페릭피로포스페이트 (20)	6.4×10^7	1.1×10^5	4.1×10^4
혐기성 슬러지	아세트산 (20)	페릭피로포스페이트 (20)	3.6×10^5	5.4×10^6	1.5×10^5
	포도당 (20)	페릭피로포스페이트 (20)	2.1×10^5	8.4×10^6	1.4×10^6
	젖산 (30)	페릭피로포스페이트 (20)	1.7×10^5	1.5×10^6	2.3×10^5

<84> 상기 표 1의 결과에서 알 수 있는 바와 같이, 호기성 슬러지 시료는 연료전지의 음극부위를 혐기 상태로 만들어주므로 통성 혐기성 균주외에는 선별되면서 계속 감소하여 전기화학적 활성을 가진 미생물만 농화 배양되는 것으로 판단되며, 혐기성 슬러지 시료는 2차 시기에서 혐기성세균이 증가하다가 3차 시기에는 감소하여 전기화학적 활성을 가진 특정 생물만 농화 배양되었다.

<85> <실시예 4>

<86> 시와 벨라 푸트레파시엔스를 이용하는 연료 전지형 바이오 센서에 의한 젖산농도 측정

<87> 젖산의 농도를 측정하기 위하여 결 환원 세균의 일종인 *시와넬라 푸트레파시엔스* (*Shewanella putrefaciens*) IR-1 (수탁번호 KCTC 8753P, 한국과학기술연구원 부설 생명공학 연구소 유전자 은행)을 사용하여 바이오센서를 제작하였다 (참조, 도 7).

<88> 이 세균은 젖산을 아세트산으로 산화하여 발생하는 환원력으로 산화제이철을 환원하는 성질을 갖는다. 양극부 (205)의 용량은 대략 20 ml로 0.1 M의 염화 나트륨이 포함된 0.05 M의 인산염 완충용액을 첨가하였고, 음극부 (204)에는 *시와넬라 푸트레파시엔스* IR-1 (건조 중량: 5 mg)와 0.1 M의 염화 나트륨이 포함된 19 ml의 0.05 M 인산염 완충용액을 첨가하였다. 음극 (201)은 0.8 X 4 X 0.3 cm 크기의 탄소 부직포를 사용하였으며, 양극 (202)은 다공성 광택 탄소 (Reticulated Vitreous Carbon; 면적: 3 X 3 X 0.3 cm)를 사용하였다. 양극과 음극은 저항 (500 Ω)을 통하여 연결되며 이때의 전압의 변화를 측정하여 전극간의 전류를 계산하였다. 전류는 전압계를 거쳐 기록계를 작동시킬 수 있도록 증폭되었으며 전류(전압)의 변화를 기록계를 사용하여 기록하였다. 작업 온도를 25℃로 유지하였고, 측정은 배경전류가 안정화된 후 각각 다른 농도의 젖산이 포함된 1 ml의 시료를 투입구 (209)를 통하여 첨가하고 시간에 따른 전류의 변화를 기록하여 초기 기울기를 구하였다.

<89> 일정 농도의 젖산을 바이오센서내로 투입하였을 때 발생하는 전류의 초기 기울기는 젖산의 농도에 비례하였으며 이는 미생물에 의하여 젖산이 산화되어 발생한 전자가 전극을 통하여 이동함을 의미하며, 젖산의 농도는 미생물의 농도가 일정할 때 발생하는 전자의 양에 비례함을 보여주고 있다. 대표적인 전류의 증가예를 도 7에 나타내고, 젖산의 농도 변화에 따른 전류 발생시의 초기 기울기를 도 8에 나타내었다. 젖산 농도에 따른 전류 초기 기울기의 상관 계수는 0.84였으며 이는 미생물의 종류, 농도, 전극의 재질 및

넓이를 변화시키거나 지향을 변화시키는 등 바이오센서의 구성을 변화시킴에 따라 개선되었다.

【발명의 효과】

<90> 바이오센서에 사용되는 연료전지의 미생물 촉매인 전기화학적 활성 세균으로 BOD

측정을 위한 생물 연료전지의 운전 과정에서 농화배양된 폐수 및 슬러지 속에 포함된 활성 세균이 사용된다. 그러므로, 본 BOD 바이오센서는 인위적인 미생물의 첨가 없이 운전될 수 있으며 폐수에 따라 적절한 세균의 활성이 유지될 수 있고, 폐수의 BOD 값을 연속적으로 측정할 수 있다. 또한, 본 발명의 BOD 측정용 바이오센서에 사용되는 생물 연료 전지는 6개월 이상 안정적으로 작동할 수 있다.

【특허 청구범위】**【청구항 1】**

측정부, 전류검출부 및 검출된 전류변화를 기록하는 기록부를 포함하며, 상기 측정부는 양극 및 음극, 이들 양극 및 음극의 전도매체 및 이들 두 극 사이의 이온 교환막을 포함하는 무매개체 생물 연료 전지를 이루어지고, 상기 음극부에는 전기화학적 활성 세균을 함유하는 시료가 첨가된 것을 특징으로 하는 BOD 측정용 바이오센서.

【청구항 2】

제1항에 있어서, 상기 측정부에 음극부의 전위를 조절하는 정전위 전해장치를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 BOD 측정용 바이오센서.

【청구항 3】

제1항 또는 제2항에 따른 BOD 측정용 바이오센서에서, 음극과 양극을 저항을 거쳐 연결한 후, 음극부에는 질소를 공급하여 혐기성 조건으로, 양극부에는 공기를 공급하여 호기성 조건으로 만들어, 시료 중에 존재하는 전기화학적 활성 세균을 상기 음극부에 농화 배양시키고, 상기 농화 배양된 전기화학적 활성 세균을 미생물 촉매로 이용함으로써 발생된 전류를 측정하여 시료 중의 BOD를 측정하는 방법.

【청구항 4】

측정부, 전류 검출부 및 검출된 전류 변화를 기록하는 기록부를 포함하며, 상기 측정부는 양극 및 음극, 이들 양극 및 음극의 전도매체 및 이들 두 극 사이의 이온 교환막을 포함하는 무매개체 생물 연료 전지로 이루어지고, 상기 음극부에 소정의 유기물을 대

사하는 단일종의 전기화학적 활성 세균이 포함되어 있는 것을 특징으로 하는 무매개체 생물 연료 전지형 유기물 농도 측정용 바이오센서.

【청구항 5】

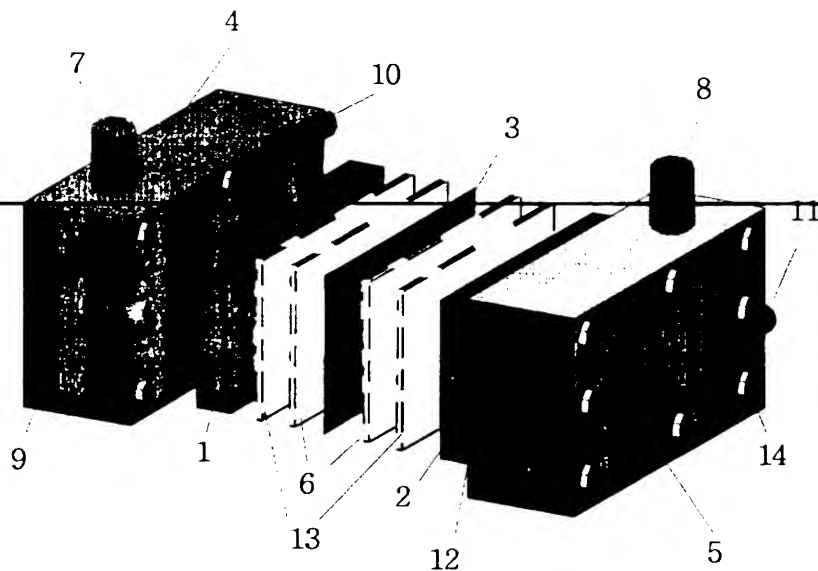
제4항에 따른 유기물 농도 측정용 바이오센서에서, 양극부에는 공기를 계속적으로 공급하여 음극부와 전압차를 유지시키면서, 측정하고자 하는 시료를 음극부에 첨가하여 음극부에 포함된 세균이 시료에 포함된 유기물을 소비하면서 생산되는 전자의 흐름을 측정함으로써 해당 유기물의 농도를 측정하는 것을 특징으로 하는 유기물 농도 측정 방법.

【청구항 6】

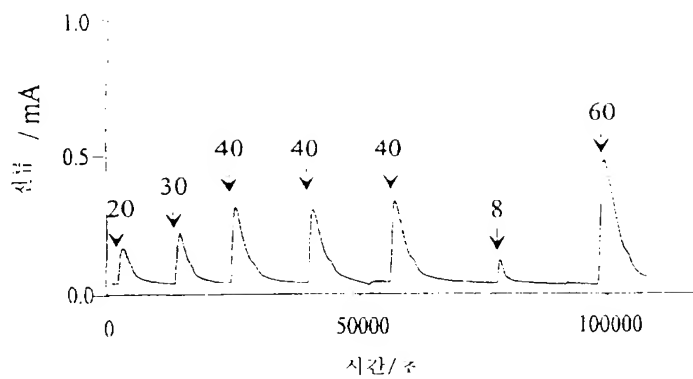
양극 및 음극, 이들 양극 및 음극의 전도매체 및 이들 두 극 사이의 이온 교환막으로 이루어지는 무매개체 생물 연료 전지에서, 음극부에는 활성 슬러지와 폐수를 첨가하고, 음극과 양극을 저항을 거쳐 연결한 후, 음극부에는 질소를 공급하여 혐기성 조건으로, 양극부에는 공기를 공급하여 호기성 조건으로 만들어 별도의 전자수용체없이 활성 슬러지와 폐수 중에 존재하는 전기화학적 활성 세균을 농화 배양하는 방법.

【도면】

【도 1】

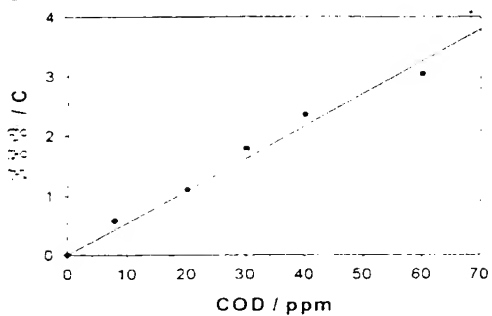


【도 2】

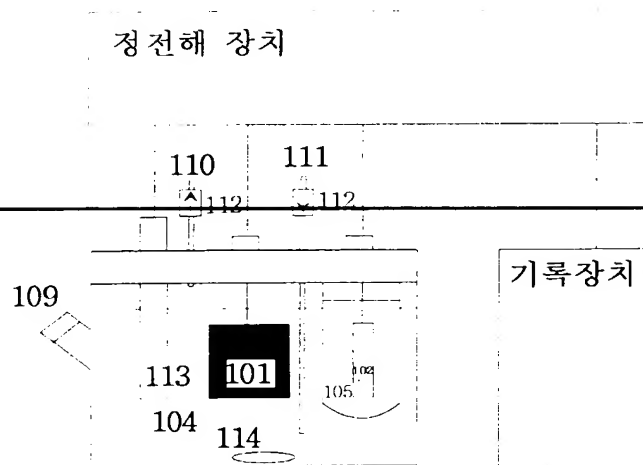


* 화살표는 첨가된 COD의 양을 표시함.

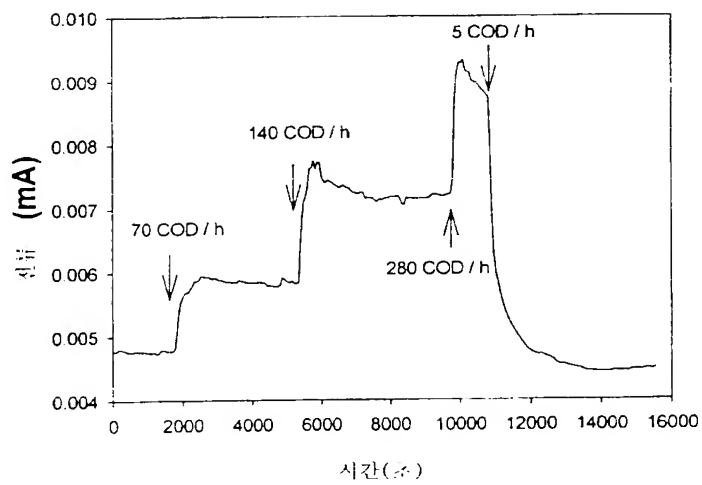
【도 3】



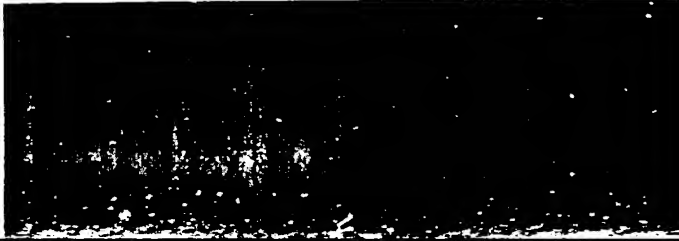
【도 4】



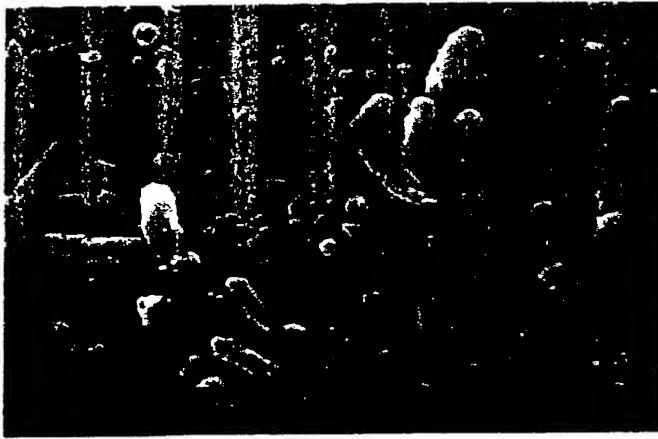
【도 5】



【도 6】

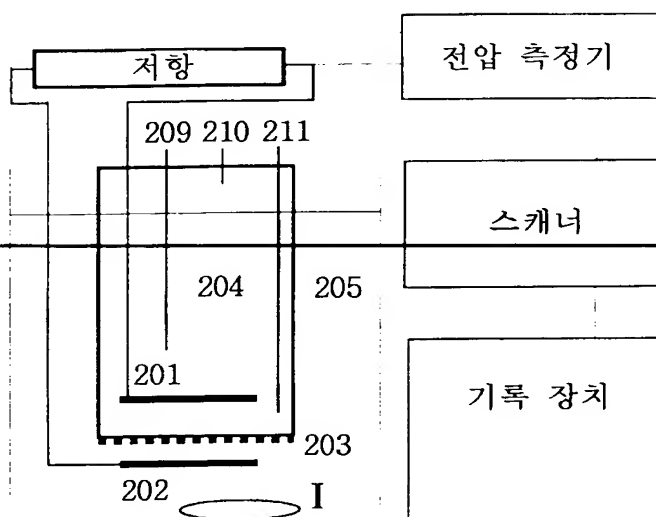


(사용 전 전극표면의 주사전자현미경 사진)



(사용 후 전극표면의 주사전자현미경 사진)

【도 7】



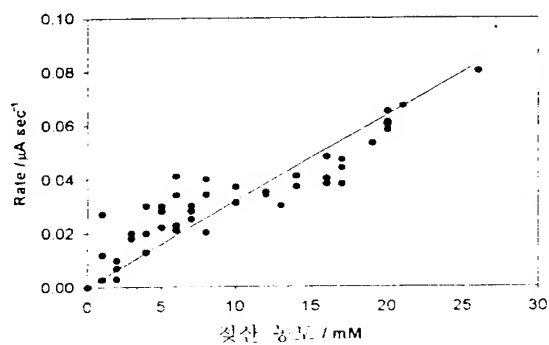
【도 8】

젖산첨가

 $2 \mu A$

100 sec.

【도 9】



【도 10】

